

# **ÚJ BIOMARKEREK A PETEFÉSZEKRÁK DIAGNÓZISÁBAN** **(A fordítás nem Dr. Ioannis Hatzipeteros, M.D. munkája)**

**Doktori (PhD) disszertáció tézisei**

**Dr. Ioannis Hatzipeteros, M.D.**

**A doktori (PhD) iskola vezetője:**

**Prof. Dr. Gócze Péter, M.D., PhD, Dsc**

**Témavezetők:**

**Prof. Dr. Gócze Péter, M.D., PhD, Dsc**

**Dr. Farkas Bálint, M.D., PhD**



**ALAPÍTVÁ: 1367 A.D.**

**Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,**

**Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika**

Pécs, 2014  
**TARTALOMJEGYZÉK**

<b>1</b>	<b>BEVEZETÉS .....</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>A DOLGOZAT CÉLJAI .....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>A 14-3-3 ZÉTA PROTEIN KLINIKAI VIZSGÁLATA MINT AZ EPITHELIALIS PETEFÉSZEKRÁK LEHETSÉGES BIOMARKERE .....</b>	<b>4</b>
	<b>3.1. Anyagok és módszerek .....</b>	<b>4</b>
	<b>3.1.1. A betegek és a követéses vizsgálat.....</b>	<b>4</b>
	<b>3.1.2. Computeres tomographia (CT) felvételek.....</b>	<b>7</b>
	<b>3.1.3. Laboratóriumi módszerek.....</b>	<b>9</b>
	<b>3.1.4. Enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálatok (ELISA).....</b>	<b>9</b>
	<b>3.1.5. Kvantitatív elektrolumineszcenciás vizsgálat (ECLIA).....</b>	<b>9</b>
	<b>3.1.6. A petefészek rosszindulatú folyamatára vonatkozó kockázati algoritmus     index (ROMA) .....</b>	<b>10</b>
	<b>3.1.7. Statisztikai elemzés.....</b>	<b>11</b>
	<b>3.2. Eredmények.....</b>	<b>12</b>
	<b>3.2.1. Terápiás beavatkozást követő radiológiai értékelés.....</b>	<b>12</b>
	<b>3.2.2. CA-125, HE4 és 14-3-3 Zéta proteinek detektálása .....</b>	<b>14</b>
	<b>3.2.3. Összefüggés a radiológiai felismerések és a szérum paraméterek között ....</b>	<b>21</b>
	<b>3.3. Megbeszélés .....</b>	<b>24</b>
	<b>3.4. Következtetések.....</b>	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>A SZERZŐ PUBLIKÁCIÓI .....</b>	<b>29</b>
<b>5</b>	<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....</b>	<b>31</b>

# 1 BEVEZETÉS

Az összes nőgyógyászati ráktípus közül a petefészekrák bizonyul a legnehezebbnek mind a diagnózist, mind a kezelést tekintve. Ezt a típusú nőgyógyászati malignitást vagy véletlenül diagnosztizáljuk (diagnosztikai laporoszkópia közben) köszönhetően a ténynek, hogy a korai stádiumokban majdnem tünetek nélkül jár, vagy előrehaladott stádiumban, amikor a tünetek esélye megnő. A fent említett okok miatt a petefészekrák az Egyesült Államokban kiérdemelte a „csendes gyilkos” elnevezést. Ez a jelenség annak köszönhető, hogy a jelenlegi korai diagnosztikai eszközeink (biomarkerek) nagyon behatároltak. A magas halálozási aránya miatt a petefészekrák az egyik legkutatottabb terület a nőgyógyászati onkológián belül.

Hippokratész, az orvostudomány atyja mondta: „aki a legjobban diagnosztizál, az is gyógyít a legjobban”. Ez a fő oka annak, hogy nekünk, orvosoknak, törekednünk kell felfedezni új diagnosztikai eszközöket, amelyek segítenek jobban szolgálni az emberiséget. Bár a 21. században járunk, a petefészekrák elleni harcban fegyvereink igen korlátozottak. Orvosokként, akiknek komoly, eskü alatti kötelessége az emberiség szolgálata, törekednünk kell a tökéletesség felé és nem nyugodhatunk, amíg ki nem fejlesztettük a megfelelő disgnosztikai eszközöket és le nem győztük e rosszindulatú betegséget.

## 2 A DOLGOZAT CÉLJAI

14-3-3 zéta egy fontos szabályozó protein, amely intracelluláris jelző utakat kapcsol össze azáltal, hogy nagyjából 100 celluláris proteinnel interferál, köztük onkogénekkal és protoonkogénekkal. Nemrégiben két egymástól független kutatócsoport, Waldemarson et al. és He et al., javasolta a 14-3-3 zétát mint az epithelialis petefészekrák lehetséges biomarkerét. Ezen kívül Kobayashi et al. nemrégiben kimutatta, hogy a 14-3-3 zéta protein jelen van az epithelialis petefészekrákkal diagnosztizált betegek ascitesében és az ascetic monocyták és makrofágok választják ki. Bár a 14-3-3 zéta protein szerepe, mint intracelluláris adaptor protein széles körben vizsgált, a kiválasztott protein funkciója tisztázatlan.

1. Jelen dolgozat célja, hogy értékelje a 14-3-3 zéta proteint, mint lehetséges új biomarkert a FIGO II-III stádiumú epithelialis petefészekrákkal diagnosztizált betegek megfigyelésére, akik kemoterápiában részesülnek.

## 3.1 Anyagok és módszerek

### 3.1.1 A betegek és a követéses vizsgálat

A vizsgálat a Pécsi Tudományegyetem Etikai Bizottsága által jóvá lett hagyva (#4076.316-251/KK15/2011), és minden páciens írásban beleegyezett a vizsgálatba.

13 betegől vettünk le perifériás vér mintákat operáció előtt, ők megkezdték a 6 ciklusos kemoterápia (paclitaxel/carboplatin; OEP Kemoterápia protokoll # 7167).

A kemoterápiás dózis a (AUC<sub>5-7.5</sub>) alapján lett kalkulálva a carboplatin és (175 mg/m<sup>2</sup>) paclitaxel esetén, és a kezelések 21 nap intervallumban lettek kivitelezve a Pécsi Tudományegyetem Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján 2012-ben.

A vérminták citrátcsövekbe lettek gyűjtve 1-2 órával a kezelések előtt. Ezután a csövek centrifugálva lettek (5000 rpm 10 percre), majd a vérplazma mintákat összegyűjtöttük és -80 °C-on tároltuk. Ha szükséges volt, a mintákat felengedtük szobahőmérsékletre, majd alaposan megforgadtuk őket, ahogy a gyártó ajánlásában javasolta.

Minden beteg esetén, 51 és 73 év között (átlagéletkor, 60 év), csak szub-optimális nőgyógyászati műtétet lehetett végrehajtani. Computer tomográfiai (CT) felvételeket készítettünk a kemoterápiás kezelés előtt és után. Ezeket a felvételeket arra használtuk, hogy értékeljük a célterület és a nem-célterület károsodásának változását. Minden egyes diagnózist az eredeti daganat hisztopatológiai vizsgálata alapján igazoltunk. A betegség stádiuma és hisztopatológiai foka (a FIGO kritérium alapján) minden rosszindulatú esetről meg lett állapítva: FIGO IIa állapot (n = 2 eset), IIIb állapot (n = 2), és IIIc állapot (n = 9) (1. Táblázat).

Beteg	Szövettan	FIGO állapot	Kor (év)	Tumor foka*
1.	Serosus	III C	69	Nagy
2.	Serosus	III C	57	Nagy
3.	Serosus	III B	51	Nagy
4.	Serosus	II A	50	Nagy
5.	Serosus	III C	67	Nagy
6.	Serosus	III C	64	Nagy
7.	Serosus	III B	73	Nagy
8.	Adenosquamosus	II B	51	Nagy
9.	Adenosquamosus	III C	69	Nagy
10.	Serosus	III C	55	Nagy
11.	Serosus	III C	71	Nagy
12.	Serosus	III C	60	Nagy
13.	Serosus	III C	53	Nagy

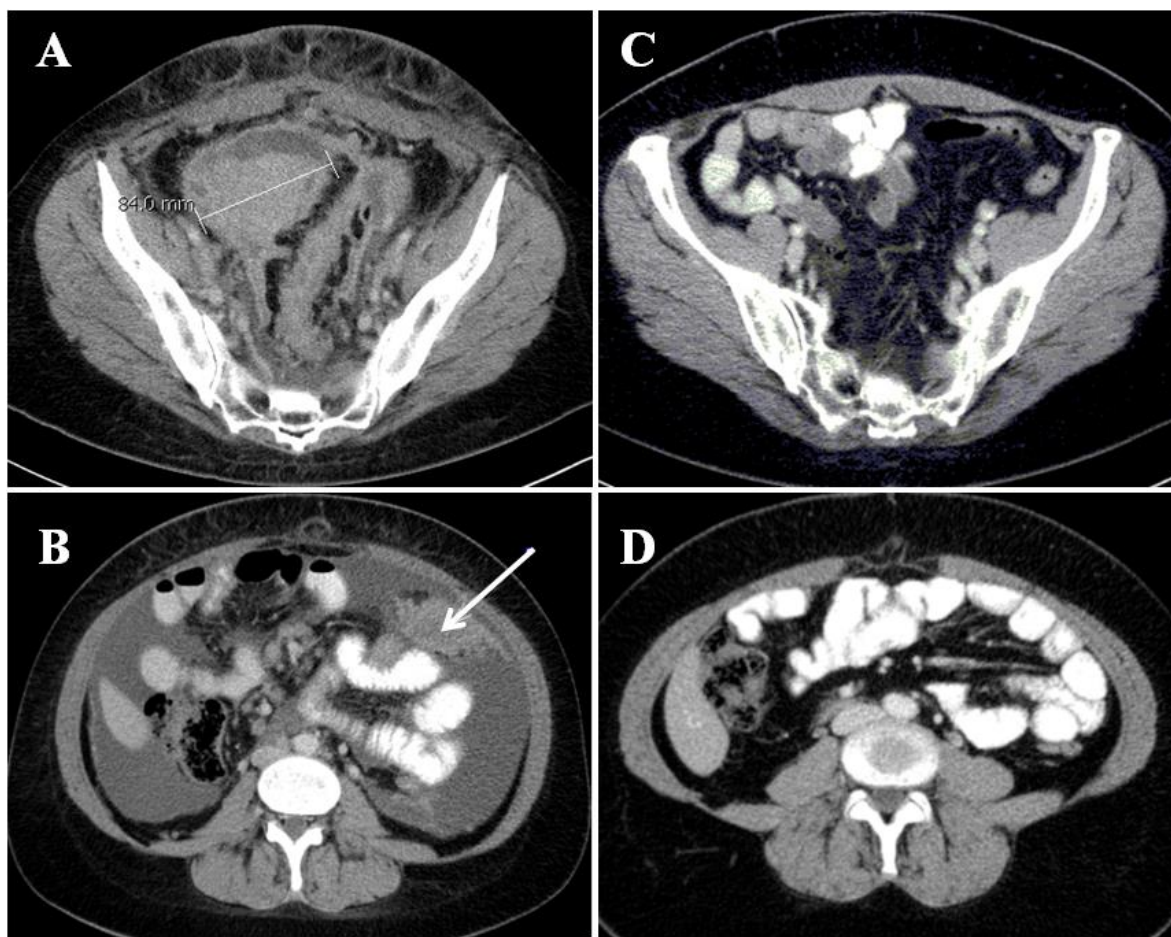
\*A Nemzetközi Nőgyógyászati és Szülészeti Szövetség (FIGO) kritériumai alapján.

*1. Táblázat: A vizsgálatba bevont betegek klinikopatológiai jellemzői, akik a paclitaxel/carboplatin-alapú kemoterápiás kezelés 6 ciklusán résztvettek.*

### **3.1.2 Computeres tomographia (CT) felvételek**

A CT felvételek a Radiológiai Klinikán (Pécsi Tudományegyetem) készültek. Folyamatos 5 mm axiális szeletek kerültek felvételre a hason és medencén keresztül. A vizsgálat előtt magas koncentrációjú jódozott kontraszt anyag került intravénásan bevitelre (Iomeron 400, Bracco Diagnostic Imaging). A felvételi területet a testalkathoz igazítottuk (hogy tartalmazza az egész testet a bőrrel együtt). A célponti és nem célponti léziók a RECIST (Responsive Evaluation Criteria In Solid Tumors) 1.1 útmutató alapján lettek meghatározva ([www.recist.com](http://www.recist.com)). Ezek az útmutatók szabályok gyűjteménye, melyeket 2009 januárjában publikált egy nemzetközi együttműködés, köztük a Rákkutatás és Kezelés Európai Szervezete, az Egyesült Államok Nemzeti Rákkutató Intézete és a Kanadai Nemzeti Rákkutató Intézet Klinikai Vizsgálati Csoportja, amely megállapítja, hogy a rákkal kezelt betegek állapota mikor javul („válasz”), nem változik („stabil”) vagy rosszabbodik („előrehalad”) a kezelés alatt. Ma azoknak a klinikai vizsgálatoknak a nagy részében, amelyek rák kezelésével kapcsolatos objektív válaszokat értékelnek ki, RECIST 1.1.-et használnak. Egy léziót mérhetőnek ítéltünk és célpont lézióként azonosítottunk, ha a tumor  $\geq 10$  mm a leghosszabb átmérője mentén a CT axiális képén  $\leq 5$  mm-

es rekonstrukciós intervallumokkal, vagy ha a nyirokcsomók  $\geq 15$  mm-esek a rövid tengelyük mentén a CT képen. Nem célponti lézióknak tekintettük: csomók  $< 10$  mm átmérővel, nyirokcsomók 10-14 mm-es átmérővel a rövid tengelyük mentén. Hasvíz, pleurális vagy pericardialis folyadékgyülem, hasüregi csomók, vagy organomegaliák fizikai vizsgálat során lettek azonosítva. Ezeket nem lehetett reprodukálható képalkotó eljárásokkal mérni. A CT felvételek 1-2 héttel a műtét után, 1-2 héttel a kemoterápia előtt és 1-2 héttel az utolsó kemoterápiás kezelés után készültek.



**1. ábra:** A 3. sorszámú betegről készült axiális CT szeletek intravénás kontrasztanyag bejutattása után. Egy célponti léziót lokalizáltunk 84 mm SLD-vel a minor pelvis mellett a 6 ciklus kemoterápia előtt (A) és után (C). A nyíl (B) egy mesentericus peritoneaisl carcinosist jelöl (nem célpont lézió) ugyanennél a betegnél amely egy szintben van a máj alsó peremével a kemoterápia előtt. Jelentős mértékű hasvíz amely a nem célpont lézióhoz társul, szintén megfigyelhető (B). (D) Mindkét nem célpont lézió hiányzik a kemoterápia befejezése után.

### 3.1.3 Laboratóriumi módszerek

#### 3.1.4 Enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálatok (ELISA)

CA-125 szérum (Fujirebio Diagnostics, Malvern, PA; Catalog #: 400-10, Lot. # 29191), a HE4 szérum (Fujirebio Diagnostics, Malvern, PA; Catalog #: 404-10, Lot# 28373), és a 14-3-3 zéta protein (Cusabio Biotech, Wuhan, China; Catalog #: CSB-EL026293HU, Lot. #A26174460) szintjét egy közbeiktatott immunoassay enzim segítségével határoztuk meg, mindig az adott gyártó protokolla szerint. A szérum koncentrációkat az Optima 2.10 R2 beépített adatfeldolgozó programjával számoltuk.

### ***3.1.5 Kvantitatívelektroluminescenciás vizsgálat (ECLIA)***

A tumor marker szinteket a Roche electrochemiluminescence teljesen automatizált immunoassay rendszerre mértük (ECLIA, Roche Diagnostics, <http://www.roche-diagnostics.com>). A CA-125 (Cat. no. 11776223) szérum és a HE4 (Cat. no. 05950929) szérum-szintek meghatározásához a mintákat a Roche Cobas e411 analizátorral dolgoztuk fel. A alap-kalibrációt és a pontatlanságot a bi-szint minőségével ellenőriztük a betegek szérum mintáinak elemzése előtt.

### ***3.1.6 A petefészek rosszindulatú folyamatára vonatkozó kockázati algoritmus index (ROMA)***

A ROMA a HE4 és a CA-125 szérum szinteket használja, melyeket vagy ELISA-val vagy ECLIA-val mértünk, és Excel táblázatban számoltunk a következő képlettel az EOC prediktív index értékének (PI) meghatározására:

Menopausa utáni nők esetén:  $PI = -8.09 + 1.04 * LN [HE4] + 0.732 * LN [CA125]$

A ROMA értéket ezek után a következőképpen számoljuk:  $ROMA \text{ érték } (\%) = \exp(PI) / [1 + \exp(PI)] * 100$ . A gyártó kézikönyve szerint, a HE4 mérése ECLIA-val és a CA-125 ELISA-val, menopausa utáni nők esetén magas kockázati EOC index 25.3% vagy ennél magasabb esetén állapítható meg.

### ***3.1.7 Statisztikai elemzés***

A statisztikai értékelések az IBM SPSS Statistic 20 (IBM Corporation) programmal lettek végrehajtva a Pécsi Tudományegyetem Bioanalitikai Intézetében. A mintaméret (n) 13, a kezelések közötti és a módszerek közötti összehasonlítások a Wilcoxon-féle előjeles rangszámösszeg próbával lettek elvégezve. A kezelések száma és a tumor markerek szérum szintje közötti összefüggés értékeléséhez lineáris regressziót és korrelációt alkalmaztunk. A tumor marker szintek és a CT felvételek eredményei közti kapcsolat vizsgálatához Spearman rangkorrelációt számoltunk. Az átlagértékeket az átlag standard hibájával együtt közlöm ( $\pm$  SEM). A szignifikanciaszint  $p < 0.05$ , vagy  $p < 0.01$ -nél lett meghatározva.

## 3.2 Eredmények

### 3.2.1 Terápiás beavatkozást követő radiológiai értékelés

A CT felvételek egy-két héttel a nőgyógyászati műtétek után készültek. Egy kezdeti laparotomia után 13-ból 10 betegnél (76.92 %) volt residuális tumor megfigyelhető a paclitaxel/carboplatin-alapú kemoterápia kezdete előtt. 6 egymást követő 21 nap intervallumú kezelési ciklus után a CT felvételeket megismételtük. E ponton a 13 beteg közül csak 4-nél (30.76 %) volt LD érték > 1 cm residuális tumor megfigyelhető. (2. táblázat). A 26 nem célponti lézió detektálása alapján a kemoterápia előtti CT felvételeken és a 3 nem célponti lézió alapján a kemoterápia utáni CT felvételeken, az EOC kezelésére alkalmazott kemoterápia hatásfoka a 6. ábrán látható.

Beteg	célpont lézió SLD-je 10 (+/- 4) d kemoterápia előtt (mm)	célpont léziók SLD-je 10 (+/- 4) d a kemoterápia utolsó ciklusa után (mm)	Nem célpont lézió változása*
1	22	0	-1
2	56	0	-1
3	84	0	-1
4	0	0	0
5	137	0	-4
6	0	0	0
7	0	0	0
8	441	202	-1
9	256	18	-3
10	147	0	-3
11	125	0	-1
12	46	18	-1
13	39	14	-3

SLD: átmérő hossz-összeg; RECIST 1.1 útmutató alapján.

\*Negatív értékek csökkenést jelentenek a lézió méretben.

**2. táblázat:** Tumor méretek értékelése a paclitaxel/carboplatin kemoterápia előtt és után CT felvételek alapján.



### 3.2.2 CA-125, HE4 és 14-3-3 Zéta proteinek detektálása

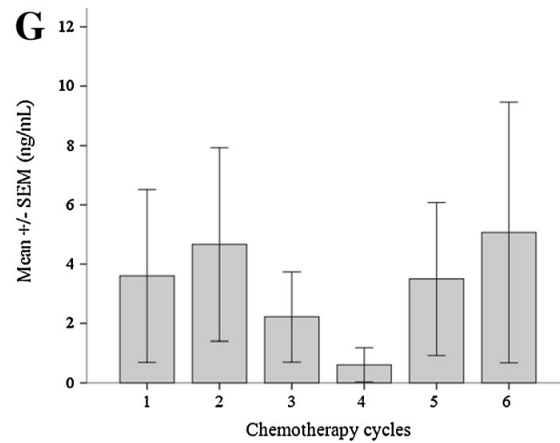
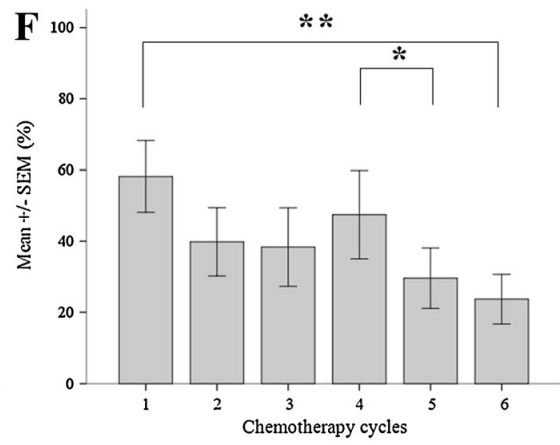
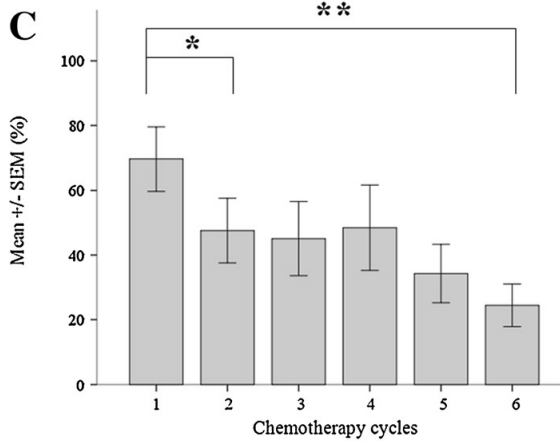
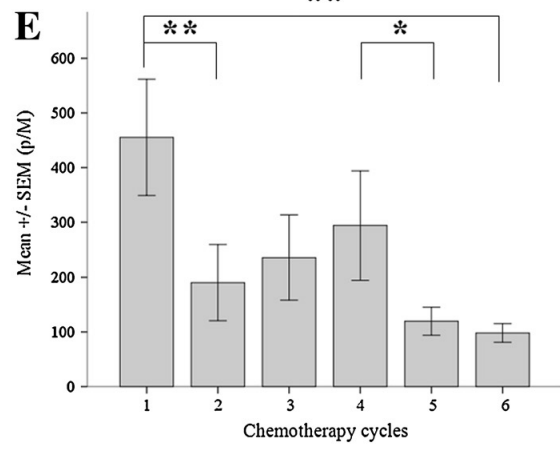
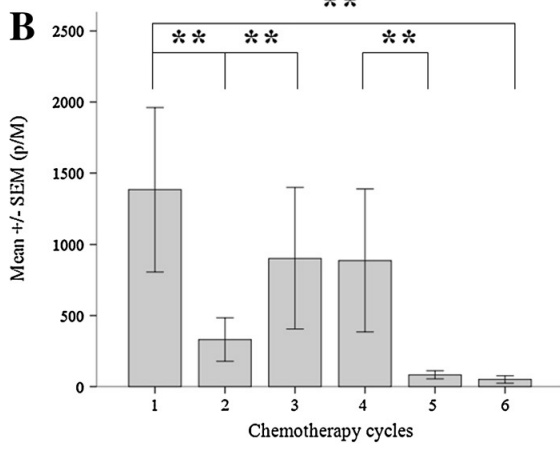
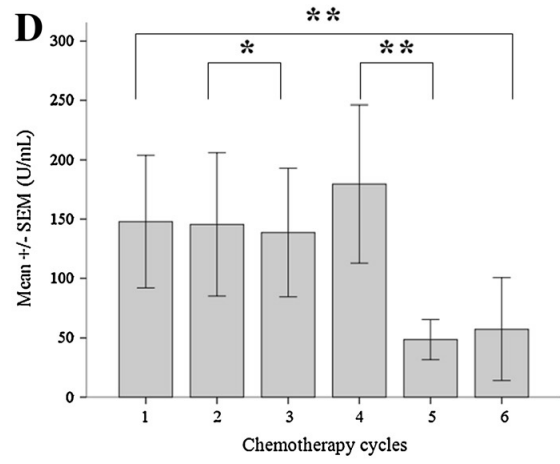
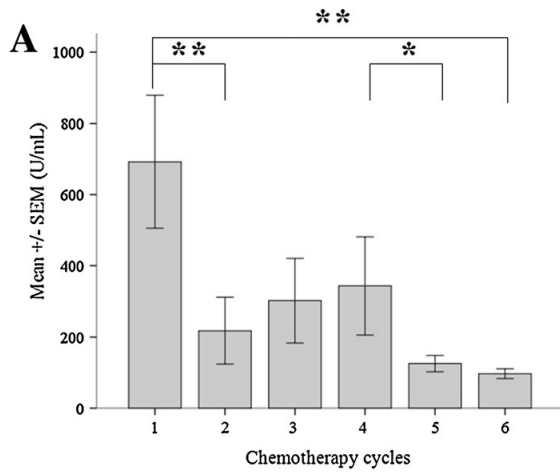
A CA-125, HE4, és a 14-3-3 zéta protein szintjeit a kezelési idő alatt ELISA és ECLIA-val monitoroztuk.

A kemoterápia első napján, a CA-125 átlagos koncentrációja  $147.87 \pm 55.98$  U/ml és  $648.26 \pm 186.52$  U/ml volt. A kemoterápia hatodik ciklusának befejezése után a CA-125 szint kisebb volt, a megfigyelt átlagos koncentráció  $58.54 \pm 30.89$  U/ml és  $119.70 \pm 22.75$  U/ml. Ehhez hasonlóan, a HE4 szérum átlagos szintje ELISA-val mérve a kemoterápia első napján  $455.32 \pm 106.39$  pM, amely lecsökkent  $120.52 \pm 23.76$  pM-re a kemoterápia befejezésére.

Az ECLIA módszert használva, a HE4 szérum szintje  $1383.49 \pm 577.23$  pM volt a kemoterápia első napján, amely lecsökkent  $70.12 \pm 26.44$  pM-re a kemoterápia befejezésére. A ROMA index értékeket minden esetben kiszámoltuk, és megfigyeltük csökkenését  $58.17 \pm 10.05$  %-ról  $28.95 \pm 7.67$  %-ra, és  $69.62 \pm 9.91$  %-ról  $30.78 \pm 7.91$  %-ra ELISA és ECLIA esetén.

A Wilcoxon teszt alapján, a kezelés elején mért és befejezését követő értékek közötti eltérés szignifikáns volt ( $p < 0.05$ ), ezáltal tovább bizonyítva az EOC kezelésére alkalmazott kemoterápia hatásosságát. (2/A-F ábra, 3. táblázat).

A kemoterápiás kezelés előtt ELISA-val mért 14-3-3 zéta protein szintek átlagos koncentrációja  $1.93 \pm 0.57$  ng/ml volt. Ezzel szemben, az egészséges, menopausa utáni nők 14-3-3 zéta protein átlagos koncentrációja (átlagéletkor, 58 év),  $0.39 \pm 0.11$  ng/ml volt. A kemoterápia kezdetén, a 14-3-3 zéta protein átlagos szérum szintje az EOC betegeknél  $2.38 \pm 1.44$  pg/ml volt, és  $2.17 \pm 1.71$  pg/ml az utolsó kezelés után. Sem az EOC betegek és az egészséges menopausa utáni páciensek esetén mért szintek közötti különbség, sem a kemoterápia elején és végén mért szintek közötti különbség nem volt szignifikáns (2/G ábra).



**2. ábra:** A biomarker szérumban átlagértékei (CA-125, HE4 and 14-3-3 zéta protein) ELISA és ECLIA módszerekkel mérve, és a ROMA index értékek. A CA-125 (U/mL)  $\pm$  SEM átlagértékeit ECLIA módszerrel (A) és ELISA módszerrel (D) ábrázoltuk a kemoterápiás ciklusnak megfelelően (az x tengelyen, 1-6-ig). A HE4 (p/M) átlagos koncentrációi, ECLIA-val mérve (B) és ELISA-val mérve (E) szintén ábrázolva vannak. Továbbá a 14-3-3 zéta protein (ng/ml) ELISA-val mért átlagértékei (G) is láthatóak. A fent említett adatok alapján kiszámoltuk a postmenopausalis ROMA index értékeit (%) az ECLIA (C) és az ELISA (F) technikára is. Közlöm a 14-3-3 zéta protein átlagértékeit (ng/mL) minden egyes kezelési napra. Wilcoxon-féle előjeles rangszámösszeg próbát végeztünk minden egyes diagramon, a szignifikanciaszintet  $p < 0.05$ -nél (\*-gal jelölve) és  $p < 0.01$ -nél (\*\*-gal jelölve) állapítottuk meg.

Patient no.	Chemo Cycle no.	ELISA			ECLIA			ELISA
		CA-125 (U/mL)	HE4 (p/M)	ROMA %	CA-125 (U/mL)	HE4 (p/M)	ROMA %	14-3-3 Z (ng/mL)
<b>1</b>	1	23.38	95.87	26.19	105.70	79.63	46.90	38.28
	2	18.09	65.94	16.60	76.82	30.69	20.57	37.95
	3	7.78	64.47	9.49	73.55	15.77	11.20	18.78
	4	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	5	10.71	67.85	12.26	77.76	8.58	6.5	32.01
	6	7.90	62.81	9.35	75.21	9	6.60	39.82
<b>2</b>	1	26.93	334.49	58.99	353.50	176.10	83	0
	2	24.28	102.01	28	116.10	106.20	56	0
	3	19.31	66.42	17.37	79.16	29.24	20.10	0
	4	10.16	87.74	14.97	88.92	18.22	14.30	0
	5	3.33	81.38	6.7	88.28	15.06	12	0
	6	0.08	85.94	0.49	87.33	13.11	10.50	0
<b>3</b>	1	1.45	43.73	2	83.1	52.97	32.6	0
	2	0	49.24	0	67.49	28.04	17.70	0
	3	3.47	52.41	4.48	69.24	23.49	15.4	0
	4	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	5	0	44.09	0	52.38	17.25	9.7	0
	6	9.12	52.37	8.68	62.76	24.63	15.10	0
<b>4</b>	1	0	48.51	0	55.06	6.78	4	1.34
	2	0	55.9	0	58.43	6.91	4.30	1.42
	3	3.63	47.48	4.18	54.72	6.71	4	0.39
	4	2.55	45.86	3.15	53.12	6.08	3.50	0.32
	5	4.35	51.67	5.16	58.04	6.59	4.10	0.26
	6	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>5</b>	1	9.23	101.40	15.93	133.4	14.60	15.20	0
	2	12.40	93.07	17.77	107.40	8.69	8.20	0

	3	2.78	85.49	6.21	103.30	7.08	6.50	0
	4	14.24	69.76	15.03	75.26	6.66	4.90	0
	5	9.10	75.68	12.20	80.91	7.95	6.20	0
	6	9.73	74.47	12.55	80.21	7.89	6.10	0
<b>6</b>	1	153.04	904	93.53	1500	701.5	98.30	0
	2	445.65	904	96.94	1218	644.20	97.90	0
	3	368.55	714.78	95.57	843.10	394.10	95.50	0
	4	249.51	541.89	92.41	540.10	243.90	90.30	0
	5	95.43	259.90	73.68	227.30	84.13	65.40	0
	6	39.94	167.57	48.43	142	46.16	38.30	0
<b>7</b>	1	77.86	118.41	51.49	111.90	68.66	44.10	4.36
	2	17.01	122.23	26.50	124.90	22.64	22.64	15.02
	3	9.25	120.03	18.50	127	18.20	17.80	8.28
	4	8	107.76	15.47	111.10	16.34	15	6.38
	5	1.07	53.14	1.98	132.50	15.39	15.80	13.13
	6	9.03	202.84	27.82	186.80	26.99	30.30	5.74
<b>8</b>	1	475.23	259.74	90.07	248.50	4810	99.2	0.04
	2	500	90.83	75.92	80.07	1265	92.7	0
	3	189.18	67.99	53.34	70.60	642.10	85.20	0
	4	500	904	97.18	1500	5000	99.8	0
	5	172.63	57.11	47.22	57.21	254.10	65.30	0
	6	402.03	62.74	64.64	57.66	256.20	65.60	0
<b>9</b>	1	21.16	904	77.35	1500	185.40	93.70	2.46
	2	29.53	170.69	43.41	176.10	61.61	49.50	1.61
	3	4.97	97.08	10.38	103.70	21.29	18.10	1.32
	4	8.13	96.13	14.09	102.70	15.37	13.50	0
	5	5.90	105.57	12.56	108.90	13.93	12.80	0.13
	6	8.57	84.25	12.96	87.24	15.70	12.40	0.06
<b>10</b>	1	500	904	97.18	1500	5000	99.8	0
	2	189.91	62.04	51.08	60.85	243.10	65.30	0
	3	500	441.44	94.22	514.20	4789	99.5	0

	4	500	149.23	84.07	155.70	833.50	93.10	0
	5	84	127.48	54.97	121.70	197.90	71.60	0
	6	29.43	90.79	28.37	92.78	54.27	35	0
<b>11</b>	1	7.85	904	62.12	1500	117.70	90.20	0
	2	9.58	201.95	28.59	200.90	36.28	38.40	0
	3	0.93	131.04	4.42	125.90	18.88	18.30	0
	4	3.75	105.53	9.34	104.40	13.74	12.30	0
	5	2.65	107.64	7.54	107.80	13.41	12.30	0
	6	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>12</b>	1	126.02	397.04	84.2	404.30	1772	98.30	0.38
	2	500	365.72	93.07	323.20	1517	97.70	0
	3	192.79	273.67	83.2	258.90	761.40	94.70	0.09
	4	178.79	223.37	79.09	192.20	360.10	86.80	0
	5	121.86	168.58	68.17	169	265.70	81.30	0
	6	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>13</b>	1	500	904	97.18	1500	5000	99.8	0
	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	3	500	904	97.18	1500	5000	99.8	0
	4	500	904	97.18	853.90	3241	99.50	0
	5	120.65	355.03	82.16	349.30	171.90	82.5	0
	6	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

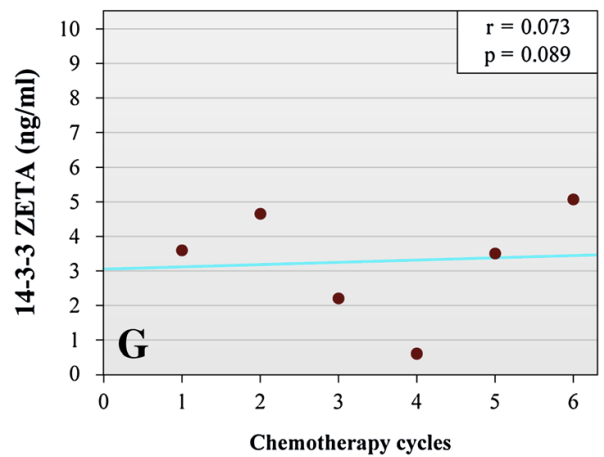
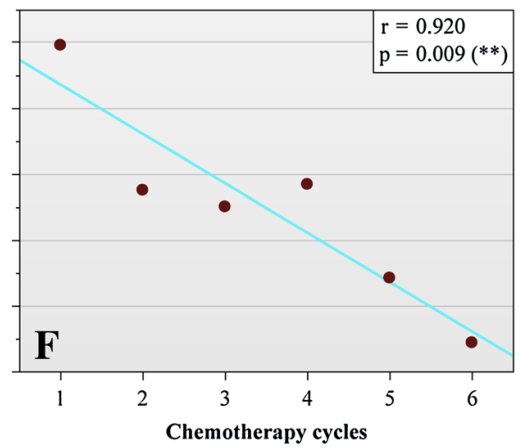
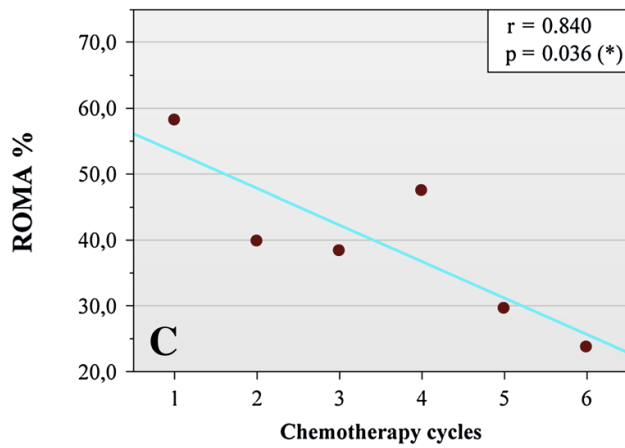
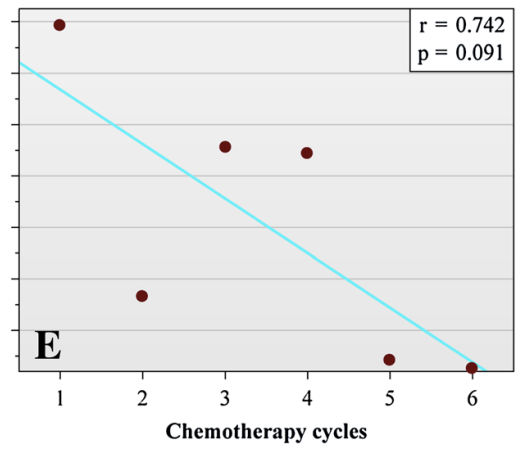
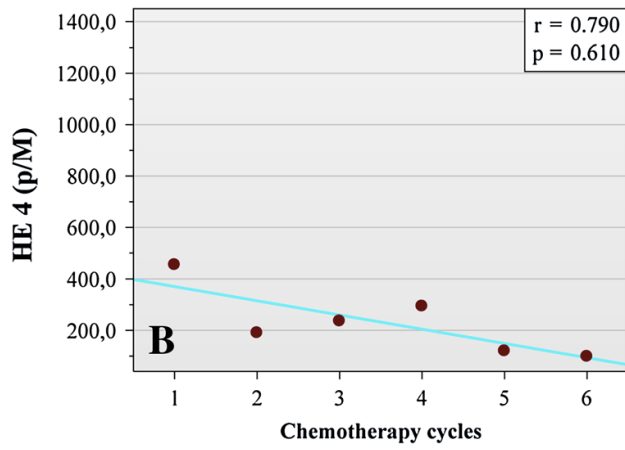
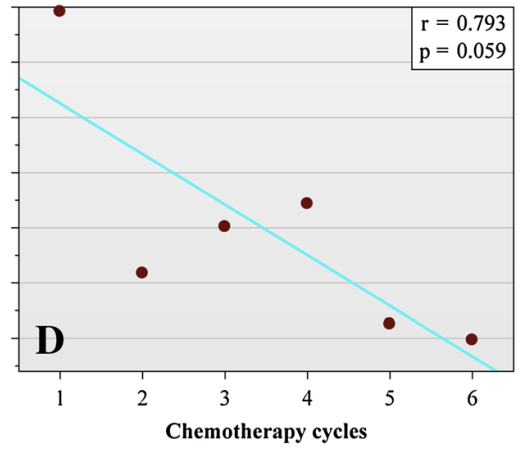
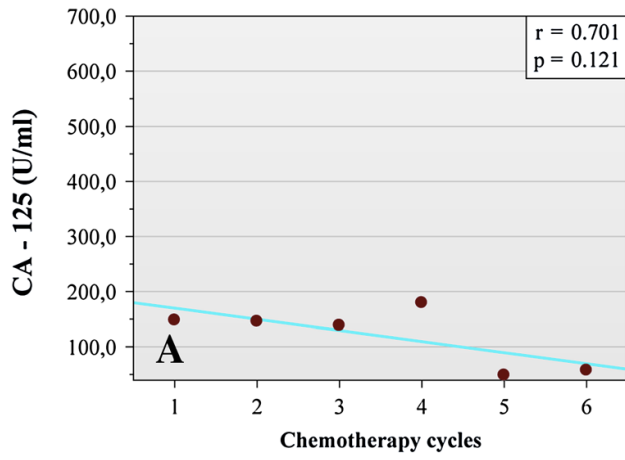
**3. táblázat:** CA-125, HE4, és 14-3-3 Z protein szintjei ELISA és ECLIA módszerekkel meghatározva.

### ***3.2.3 Összefüggés a radiológiai felismerések és a szérumbiomarkerek között***

Sem az ELISA sem az ECLIA CA-125 és HE4 szérumbiomarker mérések alapján nem kaptunk szignifikáns lineáris regressziókat és korrelációkat. A ROMA index értékek azonban, amelyeket az előbbiekből számoltunk, erős és szignifikáns korrelációt mutatnak. ( $r = 0.840$ ,  $p = 0.036$  and  $r = 0.920$ ,  $p = 0.009$ ) (3/C és F ábra). Ezen felül, 0.01-es p-érték hibahatárral, minden egyes ECLIA mérésre vonatkozóan szignifikáns lineáris korrelációt kaptunk.

A 14-3-3 zéta protein kezelési napokon számított lineáris regressziós elemzése nem mutatott szignifikáns korrelációt az átlagos szérumbiomarker értékek és a kemoterápiás ciklusok között ( $r = 0.073$ ;  $p = 0.089$ ). (3/G ábra)

A Spearman korreláció az ELISA-val mért CA-125 szérumbiomarker szintek és a CT felvétel alapján a kemoterápia után mért legnagyobb tumor átmérő között szignifikáns korrelációt mért ( $p = 0.011$ ). Az ECLIA-val mért HE4 szintek is szignifikánsan korrelálnak a tumor átmérővel ( $p = 0.04$ ), de a 14-3-3 zéta protein szintek egyik vizsgált paraméterrel sem mutattak szignifikáns összefüggést.





**3. ábra:** CA-125, HE4, és 14-3-3 zéta protein szérumban szintekben történt változás, ill. ROMA index értékek a paclitaxel/carboplatin-alapú 6 ciklusú kemoterápia alatt. A CA-125 átlagos koncentrációját ELISA-val meghatározva (A) és ECLIA-val meghatározva (D) ábrázoltuk minden egyes kezelési napra vonatkozóan. A HE4 átlagértékei ELISA-val mérve (B) és ECLIA-val mérve (E) szintén leolvashatóak minden kezelési napra vonatkozóan. A 14-3-3 zéta protein átlagos koncentrációit ELISA-val mérve (G) minden kemoterápiás napon. A postmenopausaisl ROMA index értékek ELISA (C) és ECLIA (F) alapján lettek kiszámolva. Lineáris regresszió lett illesztve minden diagramra (lásd a koreláció  $r$  értékét) és a szignifikanciaszint  $p < 0.05$ -nél lett megállapítva.

### 3.3 Megbeszélés

Számos tanulmány mutatta be az EOC detektálására egyetlen tumor markerre hagyatkozó módszerek határait. Kezdetben a CA-125 volt széles körben használt. Egyéb rosszindulatú és jóindulatú betegségek szintén bocsátanak ki CA-125-öt, ezért ez korlátozza a megbízhatóságát, mint tumor marker. A CA-125-nek magas fals-pozitív aránya van jóindulatú nőgyógyászati betegségekben, például endometriosiban szenvedő betegeknél, és alacsony a szenzitivitása a kezdeti stádiumban lévő petefészekrák azonosításában.

Ennek megfelelően, az EOC diagnózisakor a betegek 80% -a már a betegség előrehaladott állapotában van. (FIGO III-IV). Ahhoz, hogy javítsuk a petefészekrák diagnózisának specificitását és szenzitivitását, különböző tumor markereket vizsgáltunk. Az egyik új tumor marker a HE4, amely két tejsavó proteint tartalmaz (WAP) domáinok és nyolc cisztein csapadékot amely egy négy-diszulfid kötő magot alkot. HE4-et a 20q12-13.1 emberi kromoszóma lokalizálja és ennek kibocsátása szignifikánsan megnövekedett rosszindulatú transzformáció esetén. HE4-et azonban normális szövetek is kibocsátanak, ezért nem tumor specifikus. Hasonlóan, feltételezzük, hogy a HE4 funkciója is mind a spermioelcsúszáshoz, (egy proteáz gátló amely a sperma érrel kapcsolatos) mind a természetes immunitáshoz kapcsolódik, bár a HE4 funkcióinak pontos részletei még tisztázásra várnak

A petefészekrák korai felismeréséhez Moore et al. a HE4-gyel kapcsolatban, mint tumor markerről 72.9%-os szenzitivitásról és 95%-os specificitásról számol be. Ha mind a HE4, mind a CA-125 figyelembe lett véve, a szenzitivitás 76.4%-ra nőtt. Tehát több mint egy biomarker figyelembe vétele 33.1%-os növekedést eredményezett a CA-125 szenzitivitásában, és 3.5 %-os növekedést a HE4 szenzitivitásában.

Ebben a dolgozatban a ROMA értékek alapján számoltunk prediktív indexet, amely a beteg postmenopausais állapotán és a HE4, CA-125 biomarkerek jelenlétén és szintjén alapultak. Így a prediktív index a HE4 és a CA-125 szérumban szintjének pontos meghatározására támaszkodik.

Egy nemrégiben megjelent tanulmány a ROMA indexet hatékonyabbnak találta a petefészekrák előrejelzésében, mint a széles körben használt RMI (Risk of Malignancy Index), amely ultrahang leleteket, CA-125 koncentrációkat és menopaosalis állapotot használ.

Továbbá, amikor a specificitást 75%-ra állítottuk be, az RMI-nek 84.6%-os szenzitivitása volt. Ugyanehhez a specificitás értékhez a ROMA index szenzitivitása szignifikánsan magasabb volt (94.3 %). Bár biomarker koncentrációkat különböző módszerekkel lehet vizsgálni (ELISA, chemiluminescent microparticle immunoassay), Ruggeri et al. nemrégiben megjelent vizsgálata megmutatta, hogy a chemiluminescent immunoassay-ek kielégítőbbek és reprodukálhatóbbak, mint a kereskedelmi forgalomban elérhető ELISA eszközök, amelyeket az interassay pontatlansági százalék (CV %) jellemez, amely 6.8-10.3 %-ig terjed, összehasonlítva az ECLIA értéke  $< 4$  %. E dolgozat eredménye összhangban van ezen eredményekkel, és tovább támogatja az ECLIA módszer használatát a CA-125 és a HE4 szintek rutinszerű meghatározásához. Az ELISA és ECLIA közötti pontosságbeli különbség az ECLIA teljesen automatizált létrehozásának is köszönhető, amíg az ELISA-k gyakorlati vizsgálatok amelyek duplán tesztelt mintákat is igényelnek.

A 14-3-3 zéta protein fontos szerepet tölt be számos különböző biológiai mechanizmusban. Például adaptor proteinként is jellemezték intracellularis jelzések miatt, mert tartalmaz egymást követő phosphoserine motívum ismétléseket, amelyek rendelkeznek azzal a kapacitással, hogy megkössenek folyásirányú és ellentétes irányú jelző molekulákat. A 14-3-3 zéta protein elősegíti a sejtmigrációt is azáltal, hogy harmadlagos komplexet képez az integrin  $\alpha$ -4 -gyel és paxillinnel.

Lehetséges, hogy a 14-3-3 zétának a cancerogenesisben is szerepe van, mert képes kötődésre NF-kappa B-vel, beta-cateninnel, és Bcl-2-vel, és megnöveli a rákos sejtek burjánzását. Kimutatták, hogy a 14-3-3 zéta protein blokkolja a p38 mitogen-aktivált protein kináz (MAPK) aktivitását, így közvetítve egy anti-apoptotic mechanizmust. Számos vizsgálat vetette fel, hogy a 14-3-3 zéta protein egy kulcs molekula számos malignitás rosszindulatú patológiás folyamatában, beleértve az orális, nyelőcső, tüdő és mellrákot és a B sejt lymphomát.

He et al. nemrégiben megmutatta, hogy a 14-3-3 zéta protein egy lehetséges biomarker és áttét segítő faktor a petefészekrák esetén, azon az alapon, hogy immunrendszer nélküli egerek xenograft modell szérum proteomic analízisét végezte el SKOV-3 sejtekkel és tömegspektrométerrel [folyadékkromatográf - tandem tömegspektrométer (LC-MS/MS)], hogy azonosítsa a metasztázishoz kapcsolódó szérum proteineket. Szignifikánsan magasabb 14-3-3 zéta kibocsátást mértünk EOC betegeknél, mint a jóindulatú nőgyógyászati betegségekkel rendelkezőknél. Továbbá, a CA-125-höz képest, a 14-3-3 zéta protein szérum szintje szignifikánsan megnőtt amikor mikroszkópikus peritoneal metastasis volt jelen, vagy amikor mindkét petefészek be lett vonva. Ennek megfelelően a szerzők javasolták, hogy a 14-3-3 zéta protein hasznos eszköz lehet a petefészekrák FIGO stádium Ib és Ic megkülönböztetésére az Ia -tól.

Ennek ellenére ennek dolgozatnak az eredményei nem konzisztensek ezekkel a megállapításokkal. Például a 14-3-3 zéta protein szérum szintjében nem mértünk szignifikáns különbséget az egészséges menopausalis nők és az előrehaladott EOC betegek esetén. Továbbá a 14-3-3 zéta

protein szérumban szintjében nem volt szignifikáns változás a 6 egymást követő kemoterápiás kezelési ciklus közben (7/G ábra), bár a CT felvételek és a CA-125 és HE4 szintek kétségtelenül jelezték a kezelés hatásosságát.

Egy lehetséges magyarázat ezekre az eredményekre a vizsgálatba bevont betegek nem megfelelő létszáma. Későbbi vizsgálatok szükségesek nagyobb elemszámmal ahhoz, hogy statisztikailag is kimutathatóak legyenek a változások. Az is elképzelhető, hogy a szérumban proteinek lebomlásnak indulnak még akkor is, ha  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároljuk őket. Lehetséges, hogy a 14-3-3 zéta instabil protein, amelyet a mintavétel után gyorsan vizsgálat alá kell vonni.

Érdekes lehetőség, hogy a 14-3-3 zéta esetleg megköt proteinek, amelyeket chemotherapeutic ágensek aktiválnak, vagy jelen vannak a kemoterápia eredményeként, ezáltal elfedve a 14-3-3 zéta jelenlétét a szérumban. A jövőben szükség van egy nagy klinikai vizsgálatra, hogy értékelni lehessen a 14-3-3 zéta hatékonyságát, és hogy meg lehessen határozni a szenzitivitását és specificitását ennek a biomarkernek a CA-125-höz és a HE4-hez képest.

### **3.4 Következtetések**

A CA-125 és a HE4 szérumban szintjének meghatározása a ROMA indexhez hasznos eszközt jelent az EOC betegek kemoterápiás hatékonyságának előrejelzésére. Azonban a jelen dolgozat eredményei alapján a 14-3-3 zéta protein szintjei nem korreláltak megbízhatóan az EOC klinikai viselkedésével és ezért megkérdőjelezzük, hogy e betegséget tekintve hasznos biomarkernek bizonyul.

## 4 A SZERZŐ PUBLIKÁCIÓI

### **Az eredeti publikáció, amelyen a disszertáció alapul:**

**Hatzipetros I**, Gocze P, Koszegi T, Jaray A, Szereday L, Polgar B, Farkas B

*Investigating the clinical potential for 14-3-3 zeta protein to serve as a biomarker for epithelial ovarian cancer.*

**JOURNAL OF OVARIAN RESEARCH** 2013 Nov. 15;6(1):79 PMID: 24238270 **IF: 2.429**

### **Egyéb eredeti publikációk:**

**Hatzipetros I**, Gocze PM, Cziraky K, Kovacs K, Kalman E, Farkas B.

*Assessment of cells in the ascitic fluid of women with ovarian hyperstimulation syndrome: the clinical implications for subsequent ovarian malignancy.*

**REPRODUCTIVE BIOLOGY AND ENDOCRINOLOGY** 2013 Sep 12;11(1):91. doi: 10.1186/1477-7827-11-91. PMID: 24028152 **IF: 2.144**

### **Letters to the Editor:**

**Hatzipetros I**, Gocze PM, Farkas B.

*Oral Contraceptive Pills as Primary Prevention for Ovarian Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis.*

**OBSTETRICS AND GYNECOLOGY** 2013 Nov;122(5) p. 1114. doi: 10.1097/01.AOG.0000435076.57585.21. PMID: 24150022 **IF: 4.798**

**Hatzipetros I**, Drozgyik I, Bodis J.

*What is new in gynecologic oncology? Thought-provoking articles from the past year.*

**OBSTETRICS AND GYNECOLOGY** 2013 Aug;122(2 Pt 1):393-4. doi: 10.1097/AOG.0b013e31829bd8a2. PMID: 23969813 **IF: 4.798**

**AZ ÖSSZES PUBLIKÁCIÓ KUMULATÍV IMPAKT FAKTORA: 14.169**

## 5 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Az alábbiakban említett emberek támogatása és segítsége nélkül ez a PhD disszertáció nem vált volna lehetségessé.

Szeretném megköszönni Prof. Dr. Gőcze Péternek a segítségét és tanácsait, amelyekkel ellátott a PhD kutatásom és felkészülésem során. Továbbá szeretném megköszönni Dr. Farkas Bálintnak az erőfeszítéseit és tanácsait, amelyek segítettek a kutatási folyamatban.

Szeretném kifejezni a hálámat a pécsi egyetem rektorának, Prof. Dr. Bódis Józsefnek, hogy lehetőséget adott arra, hogy rezidens lehessenek a szülészeti és nőgyógyászati klinikán. Szeretnék megköszönni neki mindent, amit értem tett, mint tanárom és mentorom, miközben irányított a gyógyítás művészetének gyakorlásában.

Őszinte megbecsülésemet és hálámat fejezem ki Prof. Dr. Drozgyik István felé, amiért megtanított nekem minden szükséges klinikai ismeretet, amelynek segítségével sikeres klinikai orvos lehetek. Válaszolt minden kérdésemre, támogatott, és tanított a gyógyítás művészetére.

Ez a PhD disszertáció nem válhatott volna valósággá a szüleim, Georgia Baveli és Eleutherios Hatzipetros támogatása nélkül. Támogattak és továbbra is támogatnak, egész életem során, ezért mindörökké hálás vagyok nekik.

Egy orvosi képzés során egy doktor sok tanárral találkozik. Közülük néhányan jobban, mint mások, kitűnnek a gyógyítás művészetének tanításában. Szeretném kifejezni a tiszteletemet a Hippokratészi eskü és az ógörög hagyományok szerint tanárainknak, különösképpen Prof. Dr. Bódis József és Prof. Dr. Drozgyik István felé, akiket a „szüleimmel egyenlőnek” tekintek a Hippokratészi eskü alapján, amely kötelez engem. Tisztelettel és hálával tartozom nekik életem végéig.